

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭59—175450

⑤ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

④ 公開 昭和59年(1984)10月4日

C 07 C 59/13

8318—4H

C 12 P 7/42

6760—4B

// A 61 K 35/66

7138—4C

発明の数 1

(C 12 P 7/42

審査請求 未請求

C 12 R 1/365)

(C 12 P 7/42

C 12 R 1/785)

(C 12 P 7/42

C 12 R 1/845)

(C 12 P 7/42

C 12 R 1/465)

(全 14 頁)

⑥ ML—236B誘導体

号三共株式会社醸酵研究所内

⑦ 特 願 昭58—49491

⑦ 出 願 人 三共株式会社

⑧ 出 願 昭58(1983)3月24日

東京都中央区日本橋本町3丁目

⑨ 発 明 者 寺原昭

1番地の6

⑨ 代 理 人 弁理士 櫻出庄治

東京都品川区広町1丁目2番58

最終頁に続く

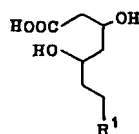
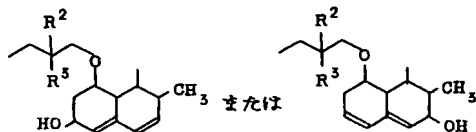
明 細 書

1. 発明の名称

ML—236B誘導体

2. 特許請求の範囲

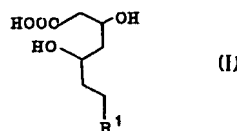
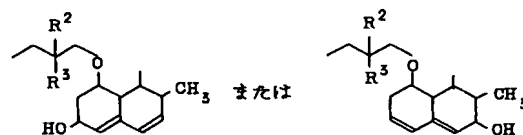
式

(式中、R¹は基

を示す。R²およびR³は同一もしくは異なつて低級アルキル基を示す。)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたはその閉環ラクトン体からなるML—236B誘導体。

3. 発明の詳細な説明

本発明は式

(式中、R¹は基

を示す。R²およびR³は同一もしくは異なつて低級アルキル基を示す。)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたはその閉環ラクトン体からなるML—236B誘導体に関する。

従来、前記一般式(I)において、R²が水素原子であり、R³がメチル基である化合物およびその誘導体は特開昭57—2240号、同57—67575号、同57—108039号および同58—10572号に記載されており、コレステロール合成阻害作

用を示すことが知られている。

本発明者らは、前記一般式(I)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたはその閉環ラクトン体がいずれもコレステロール合成阻害作用を示し、かつ安定性が高いことを見出し、本発明を完成した。

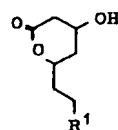
前記一般式(I)において、 R^2 および R^3 は同一もしくは異なつてメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチルのような低級アルキル基を示す。

本発明の前記一般式(I)を有する化合物の薬理上許容しうる塩としては例えば金属塩、アミノ酸塩またはアミン塩である。金属塩としては例えばナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属塩、カルシウム、マグネシウムなどのアルカリ土類金属塩、およびアルミニウム塩、鉄塩、亜鉛塩、銅塩、ニッケル塩およびコバルト塩などがあげられるが、この中、アルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩およびアルミニウム塩が好適であり、さらにナトリウム塩、カリウム塩、カ

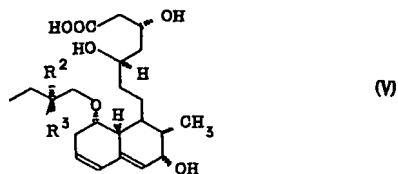
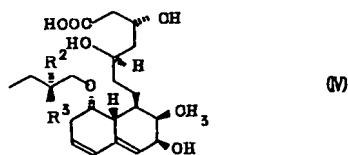
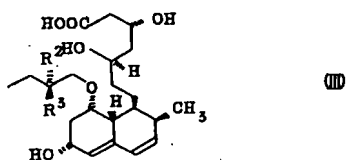
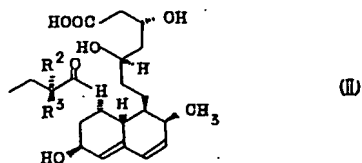
ルシウム塩およびアルミニウム塩が最も好適である。アミノ酸塩としては例えばアルギニン、リジン、ヒスチジン、 α , γ -ジアミノ酪酸、オルニチンなどの塩基性アミノ酸が好適である。アミン塩としては例えばモ-オクチルアミン、ジベンジルアミン、ジシクロヘキシルアミン、モルホリン、D-フェニルグリシンアルキルエステル、D-グルコサミンなどが好適である。

前記一般式(I)を有する化合物のエステルとしては、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、ペンチルなどのアルキルエステルをあげることができる。好適にはメチルである。

前記一般式(I)を有する化合物の閉環ラクトン体とは、式(I)が次の閉環構造式で示される化合物をいう。



本発明の前記一般式(I)においては、置換分の配置により以下のような幾何異性体が存在する。



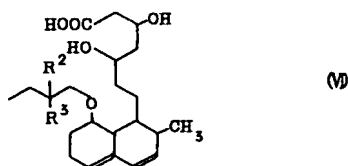
また、不斉炭素原子の存在により種々の光学異性体も存在する。前記一般式(I)においては、これらの異性体およびこれらの異性体の混合物がすべて単一の式で示されている。従つて、本発明においては、前記一般式(I)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたはその閉環ラクトン体には、前記一般式(III)乃至(V)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたはその閉環ラクトン体のみならず、これらの異性体の混合物をも全て含むものである。

本発明の目的化合物は、コレステロールの合成を阻害することにより血中の脂質を低下させる作用を有し、例えば高脂血症治療剤、動脈硬

化予防薬として医薬に使用することができる。

これらの化合物は経口的または非経口的に例えばカプセル剤、錠剤、注射剤等の形で投与することができる。投与量は年齢、症状、体重等によつて異なるが、通常は成人に対し1日約0.2～200mgを3～4回に分けて投与される。しかし必要に応じてそれ以上の量を使用することもできる。

本発明の目的化合物は式



(式中、 R^2 および R^3 は前述したものと同意義を示す。)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたはその閉環ラクトン体(原料化合物)を、3-ヒドロキシ化または6-ヒドロキシ化変換菌またはその無細胞抽出液と接触させて酵素的に水酸化し、次いで

得られた変換反応物を所望により加水分解反応、塩形成反応、エステル化反応またはラクトン化反応に付し、反応液から採取することによつて得られる。

前記原料化合物を前記一般式(I)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたはその閉環ラクトン体に変換せしめ得る微生物としては接合菌類に属するノカルディア(Nocardia)属、シンセファラストラム(Syncephalastrum)属、ムコール(Mucor)属、リゾープス(Rhizopus)属、チゴリンクス(Zygorynchus)属、シルシネラ(Circinella)属、アクチノムコール(Actinomucor)属、ゴングロネラ(Gongronella)属、フィコマイセス(Phycomyces)属、アブシジア(Absidia)属、カニンガメラ(Cunninghamella)属およびモルチエレラ(Mortierella)属と接合菌以外のピクノポラス(Pychnoporus)属(旧名トラメテス(Trametes)属)、ストレプトマイセス(Streptomyces)属およびリゾクトニア(Rhizoctonia)属があげられる。

これらに属する微生物の中、特に

ノカルディア オートトロフィカ(Nocardia autotrophica) SANK 62781(微工研菌寄第6181号)

ノカルディア オートトロフィカ subsp. キャンベリカ subsp. nov.(Nocardia autotrophica subsp. canberrica subsp. nov.) SANK 62881(微工研菌寄第6482号)

ノカルディア オートトロフィカ subsp. アメサチナ subsp. nov.(Nocardia autotrophica subsp. amethystina subsp. nov. SANK 62981(微工研菌寄第6183号)

ノカルディア オートトロフィカ(Nocardia autotrophica) IFO 12743

ノカルディア アステロイデス(Nocardia asteroides) IFO 3424

ノカルディア ファルシニカ(Nocardia farcinica) ATCC 3318

ノカルディア コエリアカ(Nocardia coeliaca) ATCC 17040

シンセファラストラム・ニグリカンス(Syncephalastrum nigricans) SANK 42172(微工研菌寄第6041号)

同 SANK 42272(微工研菌寄第6042号)

同 SANK 42372(微工研菌寄第6043号)

シンセファラストラム・ラセモーサム(Syncephalastrum racemosum) IFO 4814
同 IFO 4828

ムコール・ヒイマリス・ホルマ・ヒイマリス(Mucor hiemalis f. hiemalis) IFO 5834

同 IFO 5303

同 IFO 8567

同 IFO 8449

同 IFO 8448

同 IFO 8565

同 CBS 11708

同 CBS 10919

同 CBS 20028

同 CBS 24235

同 CBS 11019

同 CBS 20165

ムコール・バシリホルミス (*Mucor bacilliformis*) NRRL 2346

ムコール・シルシネロイデス・ホルマ・シルシネロイデス (*Mucor circinelloides f. circinelloides*) IFO 4554
同 IFO 5775

ムコール・ヒイマリス・ホルマ・コルティコルス (*Mucor hiemalis f. corticolus*) SANK 34572 (微工研菌寄第 5913 号)

ムコール・デイモルホスポラス (*Mucor dimorphosporus*) IFO 4556

ムコール・フラジリス (*Mucor fragilis*) CBS 23635

ムコール・ゲネベンシス (*Mucor genevensis*) IFO 4585

ムコール・グロボズス (*Mucor globosus*) SANK 35472 (微工研菌寄第 5915 号)

ムコール・シルシネロイデス・ホルマ・グリゼオシアヌス (*Mucor circinelloides f. griseocyanus*) IFO 4563

アクチノムコール・エレガンス (*Actinomucor elegans*) ATCC 6476

ゴングロネラ・ブトレリ (*Gongronella butleri*) IFO 8080

フィコマイセス・ブラケスレアヌス (*Phycomyces blakesleeanus*) SANK 45172 (微工研菌寄第 5914 号)

アブシジア・コエルレア (*Abisidia coerulea*) IFO 4423

アブシジア・グラウカ・パール・パラドキサ (*Abisidia glauca var. paradoxa*) IFO 4431

カニングメラ・エチヌラータ (*Cunninghamella echinulata*) IFO 4445

同 IFO 4444

同 ATCC 9244

モルチエレラ・イサベリナ (*Mortierella isabellina*) IFO 6739

ピクノボラス・コクシネウス (*Pycnoporus coccineus*) SANK 11280 (微工研菌寄第 5916 号)

ムコール・ヘテロスポルス (*Mucor heterosporus*) NRRL 3154

ムコール・スピネスセンス (*Mucor spinescens*) IAM 6071

リゾーブス・シネンシス (*Rhizopus chinensis*) IFO 4772

リゾーブス・シルシナンス (*Rhizopus circinans*) ATCC 1225

リゾーブス・アリザス (*Rhizopus arrhizus*) ATCC 11145

チゴリンクス・モエレリ (*Zygorynchus moellieri*) IFO 4833

シルシネラ・ムスカエ (*Circinella muscae*) IFO 4457

シルシネラ・リジダ (*Circinella rigida*) NRRL 2341

シルシネラ・アンペラタ (*Circinella umbellata*) IFO 4452

同 IFO 5842

同 NRRL 1713

ストレプトマイセス・ロゼオクロモゲナス (*Streptomyces roseochromogenus*) NRRL 1233

同 IFO 3363

同 IFO 3411

ストレプトマイセス・ハルステディ (*Streptomyces halstedii*) IFO 3199

ストレプトマイセス・プラテンシス (*Streptomyces platensis*) NRRL 2364

ストレプトマイセス・ファルビシマス (*Streptomyces fulvissimus*) NRRL B-1453

リゾクトニア・ソラニ (*Rhizoctonia solani*) SANK 22972 (微工研菌寄第 5917 号)

が好適である。

本発明において好適に用いられる微生物はいずれも微工研に寄託されているか、もしくは公的な保存機関 (IFO, CBS, ATCC, ^{IAM} または NRRL) より入手可能である。

本発明の方法を実施するに際して、酵素的に水酸化する方法としては、変換菌をその生育に

適した培養条件下で培養し、④変換菌の培養の中間において、原料化合物を培地中に添加してさらに培養し接触させる方法 ⑤変換菌を培養・集菌し、得られた変換菌菌体を原料化合物と接触させる方法、および ⑥変換菌菌体から調製した無細胞抽出液を原料化合物と接触させる方法で行なわれる。

変換菌の培養方法としては、通常微生物が利用しうる栄養物を含有する培地で培養することができる。栄養源としては一般微生物培養に利用される公知のものが使用できる。例えば炭素源としてグルコース、シュクロース、澱粉、グリセリン、水飴、糖蜜、大豆油等を使用しうる。また窒素源としては大豆粉、小麦胚芽、肉エキス、ペプトン、コーンステープリカー、乾燥酵母、硫酸アンモニウム等を使用しうる。その他必要に応じて食塩、塩化カリ、炭酸カルシウム、磷酸塩等の無機塩のほか、菌の発育を助剤、前記水酸化能を有する酵素の生産促進に必要な添加物を適宜組合せ使用することができる。培

異なるが、通常は培養開始後4～5日で最大となるので、この時点で培養を終了する。集菌は培養物を遠心分離、濾過等の方法に付すことによつて行なわれる。集菌された変換菌菌体は通常生理食塩水、緩衝液等で洗浄して使用するのが好ましい。

このようにして得られた変換菌菌体を原料化合物と接触させるには、通常は水性媒体中、例えばpH5～9の磷酸塩緩衝液中で行なわれる。反応温度は20～45℃、好適には25～30℃である。原料化合物の濃度は通常0.01～5.0%の範囲から選ばれる。反応時間は原料化合物の濃度、反応温度等によるが、通常1～5日位である。

⑥方法での無細胞抽出液は、上記の方法で得られた変換菌菌体に物理的または化学的手段を適用し、例えば磨砕、超音波処理等によつて菌体破産物として、または界面活性剤、酵素処理等によつて菌体溶解液として得られる。

このようにして得られた無細胞抽出液を原料

養方法としては微生物一般に用いられる培養法例えば液体培養法が可能であり、工業的には深部培養法が適している。

培養は好気的条件下で行なわれ、培養温度は20～37℃、好適には26～28℃である。

④法は、変換菌の培養途中の培地に原料化合物を添加し培養することによつて行なわれる。添加時期は、使用する変換菌の至適培養条件、特に培養装置、培地組成、培地温度等により異なるが、変換菌の水酸化能が高まりはじめる時期がよく、通常は変換菌の培養開始後2～3日経過した時点が好ましい。原料化合物の添加量は培地に対し0.01～5.0%の範囲から選ばれるが、0.05～0.1%の範囲が好適である。原料化合物添加後の培養は好気的条件下で上記培養温度で行なわれる。培養期間は原料化合物の添加後3～5日である。

⑤法は、上記の方法により変換菌を培養し、変換菌の水酸化能が最大となるまで培養する。即ち、水酸化能は培地の種類、温度等によつて

化合物と接触させる方法は、上記の変換菌菌体を原料化合物と接触させる方法と同様に行なわれる。

変換反応終了後、目的化合物は生成物から既知の方法で直接採取、分離、精製することができる。例えば生成物を濾過し、得られた濾液を酢酸エチルのような水と混和しにくい有機溶媒で抽出し、抽出液から溶媒を留去させたのち、得られた粗目的化合物をシリカゲル、アルミナ等を用いたカラムクロマトグラフに付し、適切な溶離剤で溶出することによつて分離、精製することができる。

さらに、得られた生成物は所望により、化学的常法に従つて加水分解反応、塩形成反応、エステル化反応またはラクトン化反応に付すことによつて目的化合物に変え、容易に採取することができる。

これらの方法はいずれも常法であり、例えば次のような方法である。

式(I)を有するカルボン酸は、変換反応の生成

物がカルボン酸塩である場合、得られた溶液を pH4 以下、好ましくは pH3 ~ 4 に調整することによつて得られる。使用される酸としては目的化合物に影響を与えるものでなければ有機酸または鉱酸等に限定はなく、例えばトリフルオロ酢酸、塩酸、硫酸などが好適に使用される。

このようにして得られたカルボン酸は、抽出、洗浄、脱水等の処理をした後、以下の反応に使用することができる。

式(I)を有するカルボン酸の金属塩は、該金属の水酸化物、炭酸塩等を水性溶媒中で上記カルボン酸と接触させることによつて得られる。使用される水性溶媒としては例えば水；メタノール、エタノールのようなアルコール類、アセトン、ローヘキサン、酢酸エチルなどの有機溶媒と水との混合溶媒が好適である。特に親水性有機溶媒と水との混合溶媒が好適である。反応は通常室温付近で好適に行なわれるが、必要に応じて加熱下で行つてもよい。

式(I)を有するカルボン酸のアミン塩は、アミ

~60℃付近で行なわれる。

式(I)を有するカルボン酸のアルキルエステルは、上記で得られたカルボン酸をアルコールと接触させることによつて得られる。この際、触媒として塩酸、硫酸などの鉱酸あるいはフッ化ホウ素、酸性イオン交換樹脂などが用いられ、溶媒としては同一のアルコールまたはベンゼン、クロロホルム、エーテル等反応に関与しないものが使用される。あるいは、上記で得られたカルボン酸をジアゾアルカンと接触させることによつて得られる。反応は通常ジアゾアルカンのエーテル溶液と接触させることによつて行なわれる。あるいは、上記で得られたカルボン酸の金属塩にハロゲン化アルキルを接触させることによつて得られる。使用される溶媒としては例えばジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシド、アセトンなどが好適である。

反応はいずれも室温付近で好適に行なわれるが、反応系の種類によつては必要に応じて加熱

を水性溶媒中で上記カルボン酸と接触させることによつて得られる。使用される水性溶媒としては例えば水；メタノール、エタノールなどのアルコール類、テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリルなどのニトリル類と水との混合溶媒等をあげることができるが、好ましくは含水アセトンである。反応は通常 pH 7 ~ 8.5 で室温以下、特に 5 ~ 10℃で好適に行なわれる。反応は瞬時に完了する。あるいは例えば上記で得られたカルボン酸金属塩を水性溶媒に溶解し、次いで目的のアミンの鉱酸塩（例えば塩酸塩など）を上記条件下で添加し、塩交換反応により得ることもできる。

式(I)を有するカルボン酸のアミノ酸塩は、アミノ酸を水性溶媒中で上記カルボン酸と接触させることによつて得られる。使用される水性溶媒としては例えば水；メタノール、エタノールなどのアルコール類、テトラヒドロフランなどのエーテル類と水との混合溶媒等をあげることができる。反応は通常加熱下、好ましくは 50

下で行なつてもよい。

式(I)を有するカルボン酸のラクトン体は、上記で得られたカルボン酸を触媒量の酸と接触させることによつて得られる。使用される酸としては、例えばトリフルオロ酢酸、塩酸、硫酸などの有機酸または鉱酸が好適である。反応は通常室温付近で好適に行なわれる。

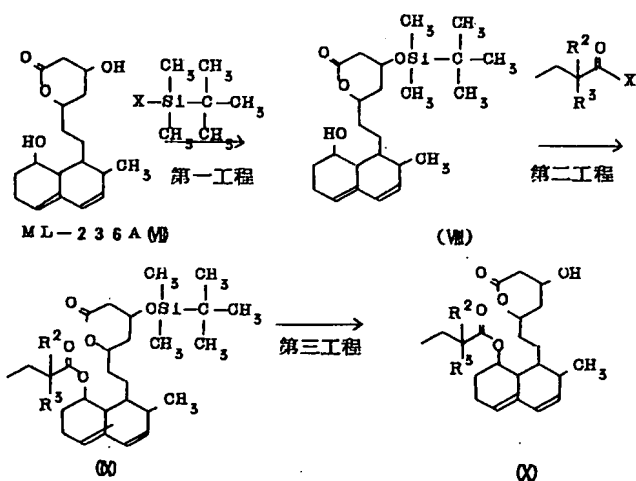
さらに、このようにして得られた目的化合物を原料として、上記の化学的常法に従つて、他の目的化合物に変えることもできる。

このようにして得られた目的化合物は種々の方法を適宜組合わせることによつて採取、分離、精製することができる。例えば活性炭、シリカゲル等の各種担体を用いる吸着またはイオン交換クロマト、あるいはセフアデツクスカラムによるゲル濾過、エーテル、酢酸エチル、クロロホルムなどの有機溶媒を用いての抽出などにより行なわれる。

特に異性体の分離は、交換反応終了後、または所望工程の終了後の適切な時期に上記の分離

精製手段により行なうことができる。

本発明の原料化合物である前記一般式(V)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたはその閉環ラクトン体は新規な化合物であり、例えばML-236A(特開昭51-136885号参照)を次の工程に従って処理することによつてその閉環ラクトン体が得られる。



れる。

このようにして得られた前記一般式(X)を有する閉環ラクトン体は常法により前記一般式(V)を有するカルボン酸、その薬理上許容しうる塩、そのエステルに変換して、本発明の原料化合物として使用される。

次に、本発明の原料化合物の製造例および実施例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

(式中、R²およびR³は前述したものとと同じであり、Xはハロゲン原子を示す。)

第一工程は前記式(V)を有する化合物を製造する工程であり、前記式(VI)を有するML-236Aを不活性溶剤中で塩基の存在下でセープチルジメチルシリルハロゲン化物と接触させることによつて得られる。

第二工程は前記一般式(X)を有する化合物を製造する工程であり、前記式(VI)を有する化合物を不活性溶剤中、触媒の存在下で2,2-ジアルキルブチリルハロゲン化物と接触させることによつて得られる。

第三工程は前記一般式(X)を有する化合物を製造する工程であり、前記一般式(X)を有する化合物を酸または塩基と接触させて水酸基の保護基を除去することによつて得られる。

各工程における目的化合物は、必要に応じて種々の方法を適宜組合せることによつて採取、精製することができる。例えば抽出法、クロマトグラフ法またはゲル濾過法などにより行なわ

原料化合物の製造例

1) 前記式(V)を有する化合物の製造

ML-236A 6.12 g (0.02 モル) を乾燥ジメチルホルムアミド 50 ml に溶解した後、イミダゾール 2.0 g (0.03 モル) およびセープチルジメチルシリルクロライド 3.6 g (0.024 モル) を加え、室温で 90 分間攪拌した。反応終了後、反応混合物に酢酸エチル 500 ml を加え、次いで順次水、1 N 塩酸、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥終了後、反応混合物より溶剤を留去すると油状物 8.2 g が得られた。得られた油状物をシリカゲル 160 g を用いたクロマトグラフに付し、ローヘキサン-酢酸エチル (1 : 1) の系で溶出させると表記化合物 7.6 g (収率 90 %) が白色粉末状として得られた。

(1) 薄層クロマトグラフィー: R_f 値 0.37

吸着剤; メルク社製シリカゲル Art 5715

展開溶媒; ローヘキサン: 酢酸エチル = 1 : 1

(2) 元素分析値 C₂₄H₄₀O₄S₁ として

計算値 C, 68.53; H, 9.58

実測値 C, 68.27; H, 9.45

2) 前記式(K)を有する化合物(R^2 および R^3 はメチル基)の製造

前記式(Ⅷ)を有する化合物 8.4 g (0.02 モル)を乾燥ピリジン 50 ml に溶解した後、2,2-ジメチルブチリルクロリド 53.6 g (0.04 モル)およびジメチルアミノピリジンを触媒量加えて、油浴中 70 ~ 80. °C で 3 時間加熱した。次いで、2,2-ジメチルブチリルクロリド 26.8 g (0.02 モル)を加えて更に 1 時間加熱した。反応終了後、反応混合物を氷水 500 ml に注入し、次いで 6 N 塩酸を加えて酸性にした。析出物を酢酸エチルで抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄後、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥終了後、抽出液より溶剤を留去すると油状物 12.7 g が得られた。得られた油状物をシリカゲル 260 g を用いたクロマトグラフに付し、ローヘキサン-酢酸エチル (9 : 2) の系で溶出させると表記化合物 3.6 g (収率 34.7 %) が淡緑黄色油状物とし

前記式(K)を有する化合物(R^2 および R^3 はメチル基) 3.1 g (6 ミリモル)を乾燥テトラヒドロフラン 20 ml に溶解した後、酢酸 2.2 ml (3.6 ミリモル)およびテトラブチルアンモニウムフルオリド ($(n-C_4H_9)_4NF$) のテトラヒドロフラン溶液 (1 ミリモル/ml 濃度) 18 ml (18 ミリモル)を加えて 40 ~ 50 °C で 60 分間撹拌した。反応終了後、反応混合物より溶剤を留去し、得られた残留物を酢酸エチル 300 ml に溶解し、次いで飽和食塩水で 5 回洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。反応混合物より溶剤を留去すると油状物 4.0 g が得られた。得られた油状物をシリカゲル 100 g を用いたクロマトグラフに付し、ベンゼン-酢酸エチル (3 : 2) の系で溶出させると表記化合物 1.4 g (収率 57.8 %) が白色泡沫状として得られた。

(1) 薄層クロマトグラフィー: R_f 値 0.20

吸着剤; メルク社製シリカゲル Art 5715

展開溶媒; ベンゼン: 酢酸エチル = 3 : 2

(2) 元素分析値 $C_{24}H_{36}O_5$ として

て得られた。

(1) 薄層クロマトグラフィー: R_f 値 0.28

吸着剤; メルク社製シリカゲル Art 5715

展開溶媒; ローヘキサン-酢酸エチル = 9 : 2

(2) 元素分析値 $C_{30}H_{50}O_5Br$ として

計算値 C, 69.46; H, 9.71

実測値 C, 69.34; H, 9.68

(3) 核磁気共鳴スペクトル (δ : ppm)

重クロロホルム中、内部標準に TMS を使用して、60 MHz で測定した。

1.06 (6 H, 一重線)

4.20 (1 H, 多重線)

4.60 (1 H, 多重線)

5.30 (1 H, 多重線)

5.45 (1 H, 多重線)

5.75 (1 H, 四重線)

5.95 (1 H, 二重線)

3) 前記式(X)を有する化合物(R^2 および R^3 はメチル基)の製造

計算値 C, 71.25; H, 8.97

実測値 C, 71.04; H, 8.85

(3) 核磁気共鳴スペクトル (δ : ppm)

重クロロホルム中、内部標準に TMS を使用して、60 MHz で測定した。

1.06 (6 H, 一重線)

4.35 (1 H, 多重線)

4.70 (1 H, 多重線)

5.28 (1 H, 多重線)

5.55 (1 H, 多重線)

5.85 (1 H, 四重線)

6.05 (1 H, 二重線)

(4) マススペクトル

M/Z : 404

実施例 1 式(Ⅱ)の閉環ラクトン体(R^2 および R^3 はメチル基)

下記組成の培地 100 ml を含有する 500 ml 容三角フラスコ 10 本にムコール・ヒイマリス・ホルマ・ヒイマリス IFO 5834 を植菌し、28 °C、220 rpm で振盪培養し、4 日後、式(Ⅳ)の閉

環ラクトン体 (R^2 および R^3 はメチル基) を最終濃度で 0.05 % になるように添加して更に 6 日間 26 °C、220 r.p.m. で培養する。

培地組成

グルコース	1.0 %
ペプトン	0.2
肉エキス	0.1
酵母エキス	0.1
コーンステープリカー	0.3
水道水	残

(pH 未修正)

培養終了後、変換反応液を尹過し、尹液をトリフルオロ酢酸で pH 3 に調整した。次いで、1 L の酢酸エチルで 3 回抽出すると式 (II) のカルボン酸 (R^2 および R^3 はメチル基) を含む区分が得られる。式 (II) のカルボン酸 (R^2 および R^3 はメチル基) は薄層クロマトグラフィー (TLC) (プレート; メルク社製シリカゲル Art 5715 溶媒; ベンゼン: アセトン: 酢酸 = 50 : 50 : 3) により R_f 値 0.50 を示す。変換率 40 %。上

- 300 型を用いて測定した。

M/Z : 420

実施例 2 式 (III) の閉環ラクトン体 (R^2 および R^3 はメチル基)

下記組成の培地 100 ml を含有する 500 ml 容三角フラスコ 10 本にシンセフアストラム・ニグリカンス BANK 42372 を植菌し、26 °C、220 r.p.m. で振盪培養し、3 日後、式 (III) の閉環ラクトン体 (R^2 および R^3 はメチル基) を最終濃度で 0.05 % になるように添加して更に 6 日間、26 °C、220 r.p.m. で培養した。

培地組成

グルコース	1.0 %
ペプトン	0.2
肉エキス	0.1
酵母エキス	0.1
コーンステープリカー	0.3
水道水	残

(pH 未修正)

培養終了後、変換反応液を尹過し、尹液をト

記抽出液を飽和食塩溶液で洗浄し、次いで硫酸ナトリウムで脱水後、触媒量のトリフルオロ酢酸を添加してラクトン化した。次いで上記抽出液を 5 % 炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮乾固した。得られた残渣をローバー・カラム (メルク社製 81 60, サイズ A) にかき、ベンゼン: アセトン = 1 : 1 の系で精製すると表記化合物 70 mg が得られた。

物性値

1) 核磁気共鳴スペクトル (第 1 図) (δ : ppm)
重クロロホルム中、内部標準に TMS を使用して、90 MHz で測定した。

2) 紫外外部吸収スペクトル

$\lambda_{\text{max}}^{\text{メタノール (nm)}} : 230, 237, 245$

3) 赤外部吸収スペクトル $\nu_{\text{max}}^{\text{CHOL}} : \text{cm}^{-1} : 3420, 1720$

4) マススペクトル

N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドでシリ化した後、日本電子製 D

リフルオロ酢酸で pH 3 に調整した。次いで、1 L の酢酸エチルで 3 回抽出すると式 (III) のカルボン酸 (R^2 および R^3 はメチル基) を含む区分が得られた。式 (III) のカルボン酸 (R^2 および R^3 はメチル基) は薄層クロマトグラフィー (TLC) (プレート; メルク社製シリカゲル Art 5715、溶媒; ベンゼン: アセトン: 酢酸 = 50 : 50 : 3) により R_f 値 0.52 を示した。上記抽出液を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水後、触媒量のトリフルオロ酢酸を添加してラクトン化した。次いで、上記抽出液を 5 % 炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水後、減圧乾固した。次いで、得られた残留物をローバー・カラム (メルク社製、81 60 サイズ A) を用い、ベンゼン: アセトン = 7 : 3 の系で精製すると、表記化合物 40 mg が得られた。

物性値

1) 核磁気共鳴スペクトル (δ : ppm)

重クロロホルム中、内部標準に TMS を使用して、100 MHz で測定した。

4.25 (1H, 多重線)

4.60 (1H, 多重線)

5.50 (1H, 多重線)

5.75 (1H, 多重線)

5.90 (1H, 四重線)

6.01 (1H, 二重線)

2) 紫外外部吸収スペクトル

 $\lambda_{\text{max}}^{\text{メソール}} (\text{nm}) : 230, 237, 245$ 3) 赤外部吸収スペクトル $\nu_{\text{max}}^{\text{liquid}} \text{ cm}^{-1} :$

3500, 1720

4) マススペクトル

N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドでシリル化した後、日本電子製 D-300 型を用いて測定した。

M/Z : 420

実施例 3 式(V)の閉環ラクトン体 (R^2 および R^3 はメチル基)

下記組成の培地 100 ml を含有する 500 ml 容坂口フラスコ 10 本にアブシディア・コエルレア IFO 4423 を接種し、26℃、120 s.p.m. で振

量のトリフルオロ酢酸を添加してラクトン化した。次いで上記抽出液を 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮乾固した。得られた残渣をローパー・カラム(メルク社製 B1 60 サイズ A)にかけた。ベンゼン：酢酸エチル(1:1)の系で精製すると、表記化合物 8.8 mg が得られた。更にこれをローパー・カラム(メルク社製 RP-8 サイズ A)を用い、3.5% アセトニトリルで溶出すると、表記化合物の精製標品 8.2 mg が得られた。

物性値

1) 核磁気共鳴スペクトル (δ : ppm)

重クロロホルム中、内部標準に TMS を使用して 100 MHz で測定した。

4.30 (1H, 多重線)

4.62 (1H, 多重線)

5.40 (1H, 多重線)

5.60 (1H, 多重線)

5.65 (1H, 四重線)

6.10 (1H, 二重線)

盪培養し、2日後、式(VI)のカルボン酸ナトリウム塩 (R^2 および R^3 はメチル基) を最終濃度で 0.05 % になるように添加して更に 5 日間 26℃、120 s.p.m. で培養する。

培地組成

グルコース	2.0 %
K_2HPO_4	0.15
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.15
NH_4NO_3	0.1
ペプトン	0.1
C.S.L	0.2
イーストエキストラクト	0.1
$ZnSO_4$	0.001
水道水	残

(pH 7.0 に調整)

培養終了後、変換反応液を尹過し、尹液をトリフルオロ酢酸で pH 3 に調整した。次いで、1 L の酢酸エチルで 3 回抽出すると式(VI)のカルボン酸 (R^2 および R^3 はメチル基) が得られる。

上記抽出液を硫酸ナトリウムで脱水後、触媒

2) 紫外外部吸収スペクトル

 $\lambda_{\text{max}}^{\text{メソール}} (\text{nm}) : 230, 235, 244 (\text{sh})$ 3) 赤外部吸収スペクトル $\nu_{\text{max}}^{\text{liquid}} \text{ cm}^{-1} :$

3400, 1720

4) マススペクトル

N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミドでシリル化した後、日本電子製 D-300 型を用いて測定した。

M/Z : 420

実施例 4 式(VI)のカルボン酸ナトリウム塩 (R^2 および R^3 はメチル基)

実施例 1 で得られた式(VI)の閉環ラクトン (R^2 および R^3 はメチル基) 10 mg を少量のアセトンに溶解し、当量の NaOH を添加して、室温に 1 時間放置した。これを 0.1N-HCl で pH 8.0 に補正し、アセトンを留去後、XAD-2 カラム (約 20 ml) にかけた。蒸留水で洗った後、50% アセトン 50 ml で溶出し、アセトンを留去させ、凍結乾燥を行なうと表記化合物 6 mg が得られた。

物性値

1) 核磁気共鳴スペクトル (δ : ppm)

重水中、内部標準に TMS を使用して、90 MHz で測定した。

3.70 (1 H, 多重線)

4.10 (1 H, 多重線)

4.30 (1 H, 多重線)

5.38 (1 H, 多重線)

5.50 (1 H, 四重線)

5.90 (1 H, 四重線)

6.00 (1 H, 二重線)

2) 紫外外部吸収スペクトル

$\lambda_{\max}^{\text{メタノール}}$ (nm): 230, 237, 245

3) 赤外部吸収スペクトル ν_{\max}^{KBr} cm^{-1} :

3400, 2900, 1730, 1585

実施例 5 式(II)のカルボン酸メチルエステル (R^2 および R^3 はメチル基)

式(II)のカルボン酸ナトリウム塩 (R^2 および R^3 はメチル基) 10 mg を水に溶解し、次いで冷却下でトリフルオロ酢酸を加えて酸性とした後、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で

3420, 2950, 1725

試験例 1 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイム A リダクターゼに対する阻害作用

本発明の化合物はコレステロール合成経路上の律速酵素として知られる 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイム A リダクターゼ (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase) を特異的に阻害する。

次に、式(II)のカルボン酸ナトリウム塩において、 R^2 および R^3 がメチル基である化合物 (化合物 A) と、 R^2 が水素原子であり、 R^3 がメチル基である化合物 (化合物 B) の 3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイム A リダクターゼに対する阻害作用をアナリティカル・バイオケミストリー [(Anal. Biochem.), 31 巻, 583 頁, 1969 年] に記載の方法で測定した。結果を表 1 に示す。

洗浄した後、ジアゾメタン溶液を加え 30 分間放置した。反応終了後、反応混合物を 5% 炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄し、次いで硫酸ナトリウムで脱水した。反応混合物より溶剤を減圧下で留去すると表記化合物が得られた。

物性値

1) 核磁気共鳴スペクトル (δ : ppm)

重クロロホルム中、内部標準に TMS を使用して、90 MHz で測定した。

3.75 (3 H, 一重線)

3.90 (1 H, 多重線)

4.25 (1 H, 多重線)

4.42 (1 H, 多重線)

5.44 (1 H, 多重線)

5.58 (1 H, 四重線)

5.92 (1 H, 四重線)

6.01 (1 H, 二重線)

2) 紫外外部吸収スペクトル

$\lambda_{\max}^{\text{メタノール}}$ (nm): 230, 237, 246

3) 赤外部吸収スペクトル $\nu_{\max}^{\text{liquid}}$ cm^{-1} :

表 1

	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイム A リダクターゼを 50% 阻害する濃度 (mg/ml)
化合物 A	19
化合物 B	30

表 1 より、化合物 A は化合物 B に比べて、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル・コエンザイム A リダクターゼ阻害作用で約 2 倍の活性を示した。

試験例 2 化合物の安定性

試験例 1 で用いた化合物 A と化合物 B との安定性を酸性領域で比較した。

1) 試験方法および結果

化合物 A 2 mg を水 5 ml に溶解した後、塩酸を加えて pH 1.0 に調整し、次いで全量を 10 ml にして 37℃ で 20 分間放置した。次いで 1 ml を採取し、0.2% 炭酸水素ナトリウム水溶液 1 ml を添加した後、液体クロマトグラフィーで化合物

Aの残存量を測定した。

す。

化合物Bについても同様に測定した。

なお、液体クロマトグラフィーはマイクロボ
ンダベックC₁₈（ウオーターズ社製）を使用し
て、0.2%PIC-A（ウオーターズ社製）を含有
する28%アセトニトリル溶液を用い1ml/min
で展開した。化合物の検出は236nmで実施し
た。結果を表2に示す。

特許出願人 三共株式会社
代理人 弁理士 櫻出 庄 治

表 2

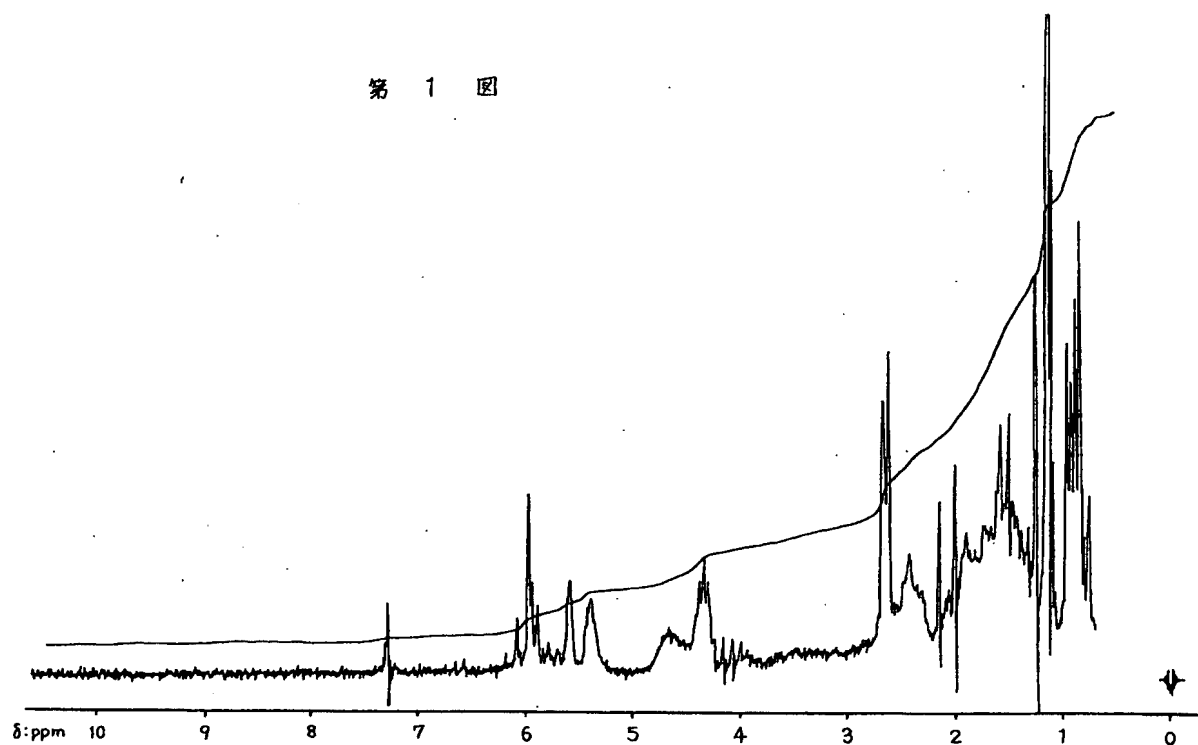
	残 存 量	
	0 分	20 分
化合物 A	100 %	57.5 %
化合物 B	100	46.0

表2より、化合物Aは化合物Bに比べて酸性
領域で安定なことが判明した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は式(II)の閉環ラクトン体（R²および
R³はメチル基）の核磁気共鳴スペクトルを示

第 1 図



昭和58年4月28日

特許庁長官 若 杉 和 夫 殿

第1頁の続き

⑦発明者 田中実

東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社分析代謝研究所
内

1. 事件の表示

昭和58年特許願第49491号

2. 発明の名称

ML-236B誘導体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋本町3丁目1番地の6

名称 (185) 三共株式会社

代表者 取締役社長 河村喜典

4. 代理人

居所 〒140 東京都品川区広町1丁目2番58号

三共株式会社内

電話 492-3131

氏名 弁理士 (6007) 櫻出庄

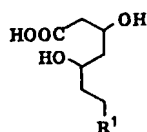
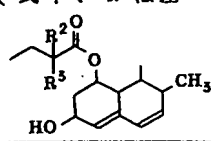
5. 補正により増加する発明の数 なし

6. 補正の対象 明細書の特許請求の範囲の欄及び
発明の詳細な説明の欄

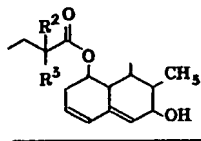
7. 補正の内容 別紙の通り

1. 特許請求の範囲を次の通り訂正する。

「式

(式中、R¹は基

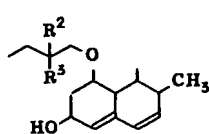
または



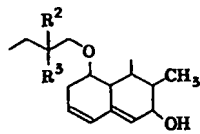
を示す。R²およびR³は同一もしくは異なつて
低級アルキル基を示す。)を有するカルボン酸、
その薬理上許容しうる塩、そのエステルまたは
その閉環ラクトン体からなるML-236B誘導体。]

2. 明細書第2頁4行の

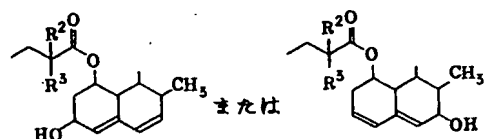
「



または

を
」

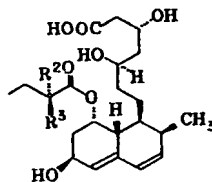
「



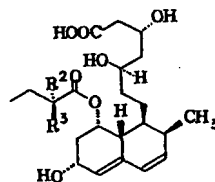
と訂正する。

3. 同第5頁乃至6頁の式(II)乃至(V)を次の通り訂正する。

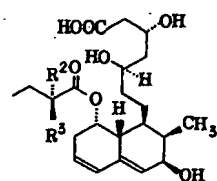
「



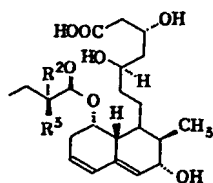
(II)



(III)

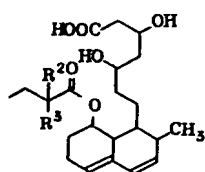


(iv)



(v)

4. 同第 7 頁 10 行の式 (iv) を次の通り訂正する。



(iv)

以 上